Aus dem Städtischen Hygienischen Universitäts-Institut
zu Frankfurt am Main
(Direktor: Professor Dr. Küster)

Die Erkennung der Tuberkelbazillen im Fluoreszenzmikroskop

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin

Der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Franz Storz
aus Schramberg im Schwarzwald
im Oktober 1940

In Dankbarkeit meinen Eltern!

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt am Main

Referent: Professor Dr. Küster
Korreferent: Dozent Dr. Sarre
Dekan: Professor Dr. Guthmann

Viele Mittel stehen dem Arzt zur Verfügung um eine Tuberkulose zu erkennen: Die klinische Untersuchung am Krankenbett, die röntgenologische Untersuchung, der mikroskopische Nachweis der Tuberkelbazillen, das Kulturverfahren der Krankheitserreger und endlich der Tierversuch Tuberkelbazillen verdächtiger Ausscheidungen des Patienten.

Wohl liefern Tierversuch und Kulturverfahren bessere Ergebnisse als die mikroskopische Untersuchung, doch ist der färberische Nachweis der Tuberkelbazillen schneller, einfacher, billiger und komplikationsloser. Deshalb ist es von großer Bedeutung, die Färbemethoden und die mikroskopische Untersuchungstechnik zu verfeinern.

Der Entdecker des Tuberkelbazillus ist Robert Koch. Ihm gelang der erste mikroskopische Nachweis der Tuberkelbazillen.

Bis heute ist die Färbung nach Ziehl-Neelsen die gebräuchlichste. Die Technik dieser Untersuchungsmethode wird hier als bekannt vorausgesetzt.

In bezug auf die Unzulänglichkeit des Ziehl-Neelsen-Verfahrens besteht allgemeine Übereinstimmung. Johannsson, Hagemann, Reploh und Josephs wiesen besonders darauf hin.

Ausgehend von der großen Bedeutung des direkten Präparates suchte Hagemann den mikroskopischen Tuberkelbazillen-Nachweis durch Anwendung der seit 1911 vorwiegend in Botanik und Zoologie bekannten Fluoreszenzmikroskopie zu verbessern.

In der Münchener medizinischen Wochenschrift 1938 Nr. 28 Seite 1066 veröffentlichte er eine Methode über Fluoreszenzfärbung von Tuberkelbakterien mit Auramin.

Ehe ich auf die Hagemannsche Färbe- und Untersuchungsmethode eingehe, möchte ich das Wesen der Fluoreszenz und die Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie erläutern.

Unter Lumineszenz verstehen wir das Aufleuchten eines Körpers dadurch, daß eine Energie auf ihn einwirkt. Die einwirkende Energie wird also in sichtbares Licht umgewandelt. Dabei kann es sich um mechanische, chemische, elektrische Energie handeln. Benützen wir Licht selbst um einen Körper sekundär aufleuchten zu lassen, so sprechen wir von Photolumineszenz.

Nun ist es möglich, daß der beleuchtete Körper nur so lange Licht aussendet, wie er selbst bestrahlt wird. Diese Art der Photolumineszenz nennen wir Fluoreszenz.

Leuchtet der Gegenstand jedoch länger auf als er bestrahlt wird, so sprechen wir von Phosphoreszenz.

Um Fluoreszenz zu erzeugen, benützen wir für unsere fluoreszenzmikroskopische Untersuchung nach Haitinger langwelliges Ultraviolett zwischen 300 und 400 μμ als Energie. Das ultraviolette Licht ist unsichtbar; das durch Energieumwandlung erzeugte Licht jedoch ist für das Auge sichtbar, da es eine größere Wellenlänge hat als das ultraviolette Licht.

Zur Erzeugung der ultravioletten Strahlen benützen wir einen Ultraviolettstrahler mit großer Flächenhelligkeit. Da dieser neben den UV-Strahlen auch noch sichtbares Licht aussendet, welches das schwächere Fluoreszenzlicht überdecken kann, ist es nötig, das miterzeugte sichtbare Licht zu absorbieren.

Zu diesem Zweck ist ein Schwarzglasfilter in den Strahlengang eingebaut. Um das von dem Schwarzglasfilter durchgelassene Rot noch wegzufiltrieren und eine Rotfluoreszenz zu verhüten, ist zwischen Lichtquelle und Mikroskopspiegel eine Küvette mit 4%iger Kupfersulfatlösung eingebaut.

Auf diese Art erhalten wir gereinigtes ultraviolettes Licht.

Von grundsätzlicher Bedeutung ist es nun, daß das Objekt nicht in ultraviolettem Licht aufleuchtet — dieses ist unsichtbar — und auch kein Schattenbild darstellt, sondern in seiner Fluoreszenzfarbe sichtbar wird. Durch Energieumwandlung ist also das Objekt selbst eine Lichtquelle.

Die Farbe, in der ein Teilchen des Präparates aufleuchtet, ist jeweils von seiner chemischen Zusammensetzung abhängig. Stellen des Präparates, die überhaupt keine fluoreszierenden Substanzen enthalten, erscheinen schwarz.

Es gibt Präparate, die in einer oder verschiedenen Farben aufleuchten, sobald das UV-Licht auf sie fällt, ohne daß sie zuvor künstlich gefärbt zu werden brauchten. In diesem Falle sprechen wir von primärer oder Eigenfluoreszenz. Andere Präparate dagegen leuchten erst auf, wenn wir sie zuvor mit fluoreszierenden Lösungen behandeln. Diese Erscheinung nennen wir sekundäre Fluoreszenz. Es können also Stoffe, die keine eigene, natürliche Fluoreszenzfarbe haben, künstlich fluoreszierend gemacht werden.

Im Grunde genommen ist es falsch, diesen Vorgang als färben zu bezeichnen, denn zum ersten können viele solche Lösungen farblos sein, zum zweiten nehmen viele Präparate nicht die Farbe des Lösungsmittels an, sondern sie erscheinen entsprechend ihrer chemischen Zusammensetzung in anderen Farben.

Haitinger bezeichnet diese „Farbstoffe" als Fluorochrome. Solche Fluorochrome gibt es in großen Mengen. Fluoreszierende Verbindungen enthalten z. B. Azo-, Thiazol-, Xanthen-, Chinolin-, Chinon-

imid-, Acridinfarbstoffe u. a. Sie werden in Form sehr stark verdünnter wässriger oder alkoholischer Lösungen zur Fluorochromierung benützt. Ferner eignen sich Pflanzenextrakte, so z. B. ein Extrakt aus den Wurzeln von Chelidonium majus, der blau fluoreszierendes Chelidonin und gelb leuchtendes Berberin enthält.

Ein weiteres Fluorochrom ist Auramin, ein in Wasser hellgelb löslicher Diphenylmethanfarbstoff.

Die Wirkung der Fluorochrome beruht teils auf selektiver physikalischer Anlagerung an die Substanzen des Präparates, zum Teil auf chemischen Reaktionen, welche die Fluorochrome mit den Teilchen des Objektes eingehen.

Ursprünglich benützte Hagemann Berberinsulfat zur Tuberkelbazillen-Fluoreszenzfärbung. Er wies aber schon in seinem 1937 erschienenen Artikel „Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über Virus und andere Mikroben" auf die Tuberkelbazillen-Fluoreszenzfärbung mit Auramin hin.

Die mikroskopischen Präparate werden nach Hagemann folgendermaßen hergestellt:

„Man läßt 15 Minuten eine 5 Prozent Phenolum liquefactum enthaltende Auraminlösung (1:1000 in dest. Wasser; nach dem Phenolzusatz gut durchschütteln) auf den in der Flamme fixierten Ausstrich einwirken, spült kräftig mit Leitungswasser ab, differenziert mit HCl-Brennspiritus (1000 ccm Brennspiritus; 4 ccm konz. reine HCl des DAB; 4 g NaCl) 3 Minuten, wobei nach 1½ Minuten der HCl-Brennspiritus erneuert wird; daraufhin abermaliges kräftiges Abspülen mit Leitungswasser. Eine Gegenfärbung unterbleibt. Die Präparate sehen makroskopisch wie ungefärbt aus."

Hagemann untersuchte im Zeiß'schen Fluoreszenzmikroskop bei 180facher Vergrößerung.

Die Tuberkelbazillen erscheinen als kleine, goldgelbe Stäbchen, die sich von dem dunkelviolett erscheinenden Untergrund und den übrigen leuchtenden Präparatbestandteilen sehr kontrastreich abheben.

Die Diagnose Tb. wird dann gestellt, wenn sich im Präparat goldgelb fluoreszierende Stäbchen finden, welche die für Tuberkelbazillen charakteristische Gestalt haben.

Hagemann untersuchte für seine Versuchsreihe sämtliche, auch die schon nach Ziehl-Neelsen positiven Proben noch kulturell.

Nach Ziehl-Neelsen fand er durch das direkte mikroskopische Präparat etwa 35% der kulturell positiven Fälle als TbB-positiv; das fluoreszenzmikroskopische Verfahren dagegen ermöglichte eine Ausbeute von mehr als 70%. Besonders groß soll die Mehrausbeute an TbB-positiven Fällen sein bei Harn, Eiter, Kot, Liquor, Pleura- und Kniepunktat, Magenspülwasser u. a.

Da mit Hilfe dieser neuen Färbe- und Untersuchungsmethode viel mehr TbB-positive Fälle gefunden wurden als mit dem Ziehl-Neelsen-Verfahren, wurden von mehreren Seiten Nachuntersuchungen angestellt.

Herrmann findet auf Grund seiner Nachprüfung die Fluoreszenzmikroskopie gegenüber der Tageslichtmikroskopie weit überlegen. Um die Färbedauer abzukürzen, erhitzt er analog der Ziehl-Neelsen-Färbung die mit Auramin übergossenen Präparate über der Bunsenflamme bis zum Aufkochen. Zur Beseitigung störender Mitfluoreszenzen und zur Erhöhung der Kontraste färbt er die Auraminpräparate mit 1‰ Kaliumpermanganatlösung und Löfflers alkalischem Methylenblau nach. Er stellt fest, daß man mit dem Fluoreszenzmikroskop die hell leuchtenden Tuberkelstäbchen auf dem dunklen Untergrund viel schneller und für das Augen müheloser findet als mit dem Tageslichtmikroskop; daß infolge der schwachen Vergrößerung das Gesichtsfeld viel größer ist als bei der Oelimmersion; daß mit dem Auramin bei weitem mehr Tuberkelbazillen dargestellt werden als mit der Ziehl-Neelsen-Färbung. Herrmann schreibt, die Fluoreszenzmikroskopie hat gegenüber der Ziehl-Neelsen-Färbung niemals versagt.

Wohl als einziger konnte Dabelstein durch die Fluoreszenzmikroskopie keine Mehrausbeute erzielen; seine Paralleluntersuchungen nach Ziehl-Neelsen ergaben volle Übereinstimmung. Einen Vorteil sieht er in dem schnelleren Arbeitstempo der Fluoreszenzmethode. Dabelstein beschreibt ein handlich aufgebautes billigeres Fluoreszenzmikroskop.

Keller, der eine intensiv leuchtende Niedervolt-Kurzfadenlampe als Beleuchtungsquelle benützt, bestätigt die großen Vorteile des Tuberkelbazillennachweises im Fluoreszenzlicht.

Ebenso bestätigt H. Küster die Vorteile der von Hagemann angegebenen Auraminfluoreszenzfärbung. H. Küster fand mit der Auraminfluoreszenzfärbung eine Steigerung der positiven Befunde um 40% gegenüber der Ziehl-Neelsen-Färbung.

Er weist darauf hin, daß sich die Auraminfluoreszenzfärbung für alle Typen von Tuberkelbazillen und für Leprabazillen, dagegen schlecht oder überhaupt nicht für andere säurefeste Bakterien eignet.

Bachmann stellt fest, daß mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie die Ausbeute an Tuberkelbazillen in vergleichbaren Abziehpräparaten wesentlich größer ist. Die Diagnose Tuberkelbazillen gelingt häufiger als bei Anwendung des Färbeverfahrens nach Ziehl-Neelsen. Außerdem hat das neue Verfahren den Vorteil der beschleunigten Diagnosestellung.

Clauberg hebt ebenfalls den durch die Fluoreszenzmikroskopie erzielten großen Zeitgewinn und die erheblich gesteigerte positive Ausbeute hervor. In einer Versuchsreihe ermittelt er fluoreszenzmikroskopisch 18% mehr positive Fälle als mit der Ziehl-Neelsen-Färbung. Die

kulturelle bzw. tierexperimentelle Nachprüfung der nur fluoreszenzmikroskopisch positiven Untersuchungsproben bestätigte die Richtigkeit der Diagnose.

Bachmann und Finke arbeiteten ein Verfahren aus zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung von Tuberkelbazillen im Gewebe, wobei sie auf die großen Vorteile der Fluoreszenzmikroskopie hinweisen.

Die große Zeitersparnis durch die Fluoreszenzmikroskopie hebt auch Didion hervor. Die Mehrausbeute an positiven Fällen durch das Fluoreszenzmikroskop findet er allerdings gering. Während Hagemann, Reiner-Müller und Herrmann sich die Mehrausbeute dadurch erklären, daß sich mit Auramin zahlenmäßig mehr Stäbchen und Granula färben als mit der Ziehl-Neelsen-Färbung, glaubt Didion den Grund für die Mehrausbeute darin zu sehen, daß die fluoreszierenden Stäbchen besser durch Zellbestandteile und Schleim hindurchleuchten.

Bei der Untersuchung von 424 Auswurfproben gelang es Mehdi Reza-Nour durch Anwendung des fluoreszenzmikroskopischen Verfahrens nach Hagemann-Herrmann die Zahl der positiven Ergebnisse um 50,5% zu erhöhen.

Finke, der ebenfalls die Überlegenheit des fluoreszenzmikroskopischen Nachweises von Tuberkelbazillen gegenüber dem Ziehl-Neelsen-Verfahren bestätigt, findet die einfache Hagemann-Färbung vorteilhafter als die Modifikation von Herrmann. Die Entfettung von Tuberkelbazillen-Kulturen mit Alkohol, Aether und Chloroform ergibt, daß fluoreszenzmikroskopisch auch noch Stäbchen nachzuweisen sind, die ihre Lipoidhülle und damit ihre Säurefestigkeit verloren haben.

Auf Grund seiner Untersuchungsergebnisse mißt Jung der Fluoreszenzmikroskopie eine überragende Bedeutung in der mikroskopischen Schnelldiagnose der Tuberkulose zu. Unter 225 Proben, die nach Ziehl-Neelsen negativ waren, findet er 22,6% fluoreszenzmikroskopisch positiv. Der Tierversuch, mit dem sich übrigens nur weitere 3% als Tb-positiv erwiesen, bestätigte, daß es sich bei den im Fluoreszenzmikroskop gefundenen Stäbchen tatsächlich um virulente Tuberkelbazillen handelt. Wie der Tierversuch und die Kultur zeigten, handelte es sich allerdings unter 30 fluoreszenzmikroskopisch positiven Sputen in 2 Fällen nicht um virulente Tuberkelbazillen, sondern um sog. Pseudotuberkelbazillen.

Rihl findet durch die Auramin-Färbung eine Steigerung der TbB-positiven Fälle um 40%. Er weist darauf hin, daß die Methode zeitsparend ist und das Auge viel weniger ermüdet als der Tuberkelbazillennachweis nach Ziehl-Neelsen, weil ein sehr großer Helligkeitsunterschied zwischen den leuchtenden Tuberkelbazillen und dem dunklen Hintergrund besteht und das Gesichtsfeld groß ist.

Im Rahmen einer Nachuntersuchung prüfte ich die von Hagemann angegebene Fluoreszenzfärbung der Tuberkelbazillen mit Auramin auf ihre Vorteile.

Zu diesem Zweck verwandte ich das Fluoreszenzmikroskop Kam F I von den optischen Werken C. Reichert, Wien XVII.

Die ganze Apparatur, sowohl der Lampenkasten als auch das Mikroskop, sind auf einer gemeinschaftlichen Grundplatte fest aufgeschraubt, und zwar so, daß das Mikroskop ein für allemal auf den Strahlengang der Lampe optimal eingestellt ist. Die ganze Apparatur ist in einer Dunkelkammer aufgestellt.

Als Quelle für das ultraviolette Licht wird eine Metalldampflampe verwendet, die an Wechselstrom angeschlossen ist und in einem Lampenkasten steht, der das Licht nach außen abschirmt. Zwischen Lampe und Wandkontakt ist ein Umformer eingeschaltet, welcher der Netzspannung entsprechend berechnet ist. Die Lampe nimmt im Dauerzustand etwa 0,75—0,8 Ampère. Hierbei beträgt die Lampenspannung etwa 100 Volt. Der Leistungsverbrauch der Lampe allein ist etwa 75 Watt.

Das von der Lampe ausgesandte Licht wird von einem aplanatischen Ultraviolettkollektor gesammelt und durch ein Schwarzglasfilter und eine in einer Küvette befindlichen Kupfersulfatlösung von seinem Anteil an sichtbarem Licht befreit. Um bei der Einstellung der Apparatur das ultraviolette Licht auf dem Mikroskopspiegel zu zentrieren, schaltet man an Stelle des Schwarzglasfilters eine Opalglasscheibe ein.

Zum Mikroskopieren benützt man ein Mikroskop, dessen Spiegel und Kondensor das UV-Licht reflektiert bzw. durchläßt. Beide sind zu diesem Zweck aus besonderem Glas hergestellt.

Als Objektträger werden gewöhnliche Gläser benützt, wie sie auch bei der Tageslichtmikroskopie verwendet werden. Da das fluoreszierende Präparat durch Energieumwandlung in sichtbarem Licht aufleuchtet, sind Objektiv und Okular des Mikroskopes aus den üblichen Glassorten hergestellt. Um aber den kleinen Anteil von ultraviolettem Licht, der unverwandelt das Präparat passiert, vom Auge des Untersuchenden fern zu halten und Schädigungen des Auges zu vermeiden, liegt über dem Okular ein Ultraviolettsperrfilter.

Die Tuberkelbazillen leuchten bei der mikroskopischen Betrachtung als kleine, schmale, leicht gekörnelte, gelbe Stäbchen auf, die man nach einiger Übung sofort und eindeutig erkennt. Die Umgebung der Tuberkelbazillen erscheint in einem blaugräulichen Licht.

Außer den Tuberkelbazillen können sich auch andere Substanzen entsprechend ihrer chemischen Zusammensetzung mit Auramin „färben". Sie können ebenfalls gelb aufleuchten, jedoch werden sie infolge ihrer Größe, Form, Zusammensetzung und Helligkeit nicht mit den Tuberkelbazillen verwechselt.

Ich untersuchte die Ausstriche von 400 Sputen, die im Laufe einiger Wochen von praktischen Ärzten, Kliniken und Untersuchungsstellen zur Untersuchung auf Tuberkelbazillen an das Hygienische Institut der Universität Frankfurt M. eingesandt wurden.

Von jedem Sputum wurden zwei Originalausstriche gemacht, luftgetrocknet und über der Flamme fixiert. Den einen der beiden Originalausstriche machte ich dünn, den anderen eine Spur dicker. Der dünnere Ausstrich wurde nach Ziehl-Neelsen gefärbt, während der etwas dickere Ausstrich nach der Hagemannschen Vorschrift mit Auramin und anschließend mit Salzsäure-Alkohol behandelt wurde.

Ein jedes Ziehl-Neelsen-Präparat wurde sorgfältig von zwei Untersuchern angesehen, wobei beide Untersucher völlig unabhängig von einander arbeiteten.

Unter den ersten hundert Sputen wurden gefunden:
12 TbB-positive Ziehl-Neelsen-Präparate und
18 TbB-positive Auraminfluoreszenz-Präparate.
Unter den zweiten hundert Sputen wurden gefunden:
15 TbB-positive Ziehl-Neelsen-Präparate und
20 TbB-positive Auraminfluoreszenz-Präparate.
Unter den dritten hundert Sputen wurden gefunden:
8 TbB-positive Ziehl-Neelsen-Präparate und
14 TbB-positive Auraminfluoreszenz-Präparate.
Unter den vierten hundert Sputen wurden gefunden:
16 TbB-positive Ziehl-Neelsen-Präparate und
24 TbB-positive Auraminfluoreszenz-Präparate.

Unter den vierhundert Sputen stellte ich also mit der Ziehl-Neelsen-Färbung und Tageslichtmikroskopie 51 TbB-positive Fälle fest, während mit der Auramin-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie 76 TbB-positive Fälle gefunden wurden. Das bedeutet eine Leistungssteigerung um 33%.

Wurde ein Sputum im Ziehl-Neelsen-Präparat TbB-negativ, im Auramin-Präparat jedoch TbB-positiv befunden, so wurde das Ziehl-Neelsen-Präparat nochmals genauestens nachgesehen. In ganz vereinzelten Fällen fanden sich dann im Ziehl-Neelsen-Präparat doch noch Tuberkelbazillen.

Diese Steigerung der Ziehl-Neelsen positiven Fälle ist in den oben angegebenen Zahlen mit eingerechnet.

Aus diesen Zahlen ist die Überlegenheit der Fluoreszenzmikroskopie gegenüber der Tageslichtmikroskopie deutlich ersichtlich.

Daß die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung unter den 400 Sputen 25 positive Fälle mehr ergab, ist der Überlegenheit des Fluoreszenzmikroskopes und der Auraminfärbung zuzuschreiben. Hagemann, Reiner-Müller und Herrmann erklären sich die Mehrausbeute mit dem Fluoreszenzmikroskop dadurch, daß sich mit Auramin zahlenmäßig mehr Stäbchen und Granula färben als mit der Ziehl-Neelsen-

Färbung. Didion dagegen sieht den Grund für die Mehrausbeute darin, daß die fluoreszierenden Stäbchen besser durch Zellbestandteile und Schleim hindurchleuchten. Beide Ansichten besagen, daß im Fluoreszenzmikroskop mehr Tuberkelbazillen zur Darstellung kommen.

Ein weiterer Grund für die Mehrausbeute liegt in dem großen Gesichtsfeld des Fluoreszenzmikroskopes. Da zur fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung eine nur 180 fache Vergrößerung genügt, ist das Gesichtsfeld größer als im Tageslichtmikroskop. Der Grund, weshalb die Tuberkelstäbchen im Auramin-Präparat trotz der geringen Vergrößerung ebenso groß erscheinen wie die Tuberkelbazillen des Ziehl-Neelsen-Präparates, liegt darin, daß selbstleuchtende Gebilde größer erscheinen als solche, die nur durch Kontrastwirkung zur Darstellung kommen.

Weiterhin läßt sich die Mehrausbeute mit dem Fluoreszenzmikroskop durch den eindrucksvollen Helligkeitsunterschied zwischen den leuchtenden Tuberkelbazillen und dem dunklen Untergrund erklären.

Endlich ergibt sich die Mehrausbeute aus dem bedeutenden Leuchtkontrast und dem großen Gesichtsfeld, die beide ein für das Auge müheloses und rasches Suchen ermöglichen.

Entgegen der Hagemannschen Vorschrift machte ich die Ausstriche für die Auraminbehandlung etwas dicker als die für die Ziehl-Neelsen-Färbung bestimmten Ausstriche. War ein für die Auraminfärbung bestimmter Ausstrich zufällig doch einmal etwas zu dick geraten, so wurde er eben entsprechend länger mit Salzsäure-Alkohol nachbehandelt, ohne daß sich daraus ein Nachteil ergeben hätte. — Im größeren Material werden eher Tuberkelbazillen gefunden.

Öfters wurde das Sputum eines verdächtigen Patienten vom praktischen Arzt wiederholt zur Untersuchung eingesandt. Dabei kam es mehrmals vor, daß das Ziehl-Neelsen-Präparat des ersten Sputums negativ war, ebenso das Ziehl-Neelsen-Präparat des zweiten Sputums, während erst das Ziehl-Neelsen-Präparat des dritten Sputums einunddesselben Patienten TbB-positiv war.

Das Auramin-Präparat dagegen war schon das erstemal (und auch das zweite- und drittemal) TbB-positiv.

Es tritt nun die Frage auf, ob die im Fluoreszenzmikroskop für Tuberkelbazillen gehaltenen Stäbchen tatsächlich Tuberkelbazillen sind:

1. In allen bisher erschienenen Arbeiten kommt klar zum Ausdruck, daß es sich bei den kleinen, schmalen, leicht gekörnelten, gelb fluoreszierenden Stäbchen des Auramin-Präparates tatsächlich um Tuberkelbazillen handelt. Besonders beweisen die kulturellen bzw. tierexperimentellen Nachprüfungen von Herrmann, Clauberg, Didion und Jung die Richtigkeit der Diagnose.
2. Niemals wurde das Auramin-Präparat negativ befunden in einem Falle, wo das Ziehl-Neelsen-Präparat TbB-positiv war. Selbst

Dabelstein, der wohl als einziger mit dem Fluoreszenzmikroskop keine Mehrausbeute fand, stellt fest, daß die Paralleluntersuchungen nach Ziehl-Neelsen volle Übereinstimmung ergeben. Die Tuberkelbazillen haben zu Auramin eine noch größere Affinität als zu Carbol-Fuchsin.

3. Aus den 25 Auramin-Präparaten, die im Fluoreszenzmikroskop TbB-positiv gefunden wurden, deren zugehörige Ziehl-Neelsen-Präparate im Tageslichtmikroskop aber negativ waren, griff ich wahllos zehn heraus, färbte sie ohne weiteres noch nach Ziehl-Neelsen und betrachtete sie daraufhin im Tageslichtmikroskop:
   Während die Original-Ziehl-Neelsen-Präparate der entsprechenden Sputen im Tageslichtmikroskop TbB-negativ waren, zeigten alle zehn Auramin-Ziehl-Neelsen-Präparate eindeutig Tuberkelbazillen. Die roten Tuberkelbazillen lagen, wie der Nonius des Kreuztisches zeigte, an den Stellen, wo zuvor die gelb fluoreszierenden Stäbchen gefunden worden waren.
4. Einige Ziehl-Neelsen-Präparate, die im Tageslichtmikroskop TbB-negativ waren, deren zugehörige Auramin-Präparate im Fluoreszenzmikroskop jedoch positiv waren, entfärbte ich mit Salzsäure-Alkohol, behandelte sie dann mit Auramin und fand nun bei der Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop Tuberkelbazillen. — Nach erneuter Färbung dieses Präparates nach Ziehl-Neelsen waren nun im Tageslichtmikroskop eindeutig Tuberkelbazillen zu sehen.

Diese Versuche beweisen nicht nur, daß die feinen, schmalen, leicht gekörnelten, gelb fluoreszierenden Stäbchen des Auramin-Präparates tatsächlich Tuberkelbazillen sind; sie zeigen auch, daß die Tuberkelbazillen zu Auramin eine größere Affinität haben als zu Carbol-Fuchsin. Auf diese Art lassen sich die unter 3. und 4. angebenen Tatsachen erklären.

Nach den oben geschilderten Versuchen taucht nebenbei die Frage auf: Kann man sich die Fluoreszenzmikroskopie ersparen? Erhält man die gleiche Leistungssteigerung, wenn man das Ziehl-Neelsen-Präparat mit Auramin vorbehandelt und es im Tageslichtmikroskop untersucht?

Schließlich muß noch zu der Frage „Pseudotuberkelbazillen" im Auramin-Präparat Stellung genommen werden:

In einem einzigen Falle — es handelt sich dabei um Drüseneiter — fand Herrmann das Auramin-Präparat positiv, das Kulturergebnis war aber negativ. Er glaubt, daß die Fluoreszenzmikroskopie die nicht mehr kulturfähigen Tuberkelstäbchen nachzuweisen imstande ist. Clauberg nimmt an, daß die neben den hell leuchtenden Tuberkelbazillen vorkommenden schwach grünlichen Gebilde gleicher Form und Größenordnung vermindert säurefeste Kochsche Bazillen sind. Didion meint, vielleicht handelt es sich bei den gelben wie gelbgrünlichen Stäbchen des Auramin-Präparates, die in Kultur und Tierversuch nicht als Tuberkel-

bakterien zu diagnostizieren sind, um säurefeste Saprophyten, vielleicht um abgestorbene Tuberkelbakterien. Daß die Stäbchen weniger Auramin-Präparate geringer leuchten oder mehr grünlich schimmern, ist nach Jung darauf zurückzuführen, daß es sich um Tuberkelbazillen alter tuberkulöser Herde handelt, deren Säurefestigkeit durch Beeinflussung seitens des Wirtsorganismus geschädigt wurde. Unter dreißig fluoreszenzmikroskopisch positiven Sputen blieben zwei im Tierversuch absolut negativ. Dabei handelt es sich nach Jung um „Pseudotuberkelbazillen", wie sie bei Bronchiektasien, Lungengangrän, infizierten Infarkten und eitriger Bronchitis vorkommen sollen.

Endgültig läßt sich diese Frage jedoch noch nicht beantworten. Die biochemischen Grundlagen der Säurefestigkeit und des sekundären Fluoreszenzvermögens bei sog. säurefesten Stäbchen sind noch nicht vollkommen klar erkannt. Diese Fragen werden erst noch geklärt werden müssen.

Zusammenfassung.

Vergleichen wir abschließend Fluoreszenzmikroskopie und Tageslichtmikroskopie miteinander, so stellen wir fest:

1. Mit der Auramin-Fluoreszenzmikroskopie wurden von mir 33% mehr TbB-positive Fälle gefunden als mit der Ziehl-Neelsen-Färbung.
2. Ein wesentlicher Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie besteht darin, daß die Ausstriche für die Auramin-Färbung etwas dicker angefertigt werden können, weil die fluoreszierenden Stäbchen auch durch dickere Schleimschichten hindurchleuchten.
3. Aus diesem Grunde können durch die Auramin-Fluoreszenzmikroskopie zahlenmäßig mehr Tuberkelbazillen dargestellt werden, so daß sich bei gleicher Vergrößerung im Gesichtsfeld mehr Tuberkelbazillen finden als in dem dünneren Ziehl-Neelsen-Präparat.
4. Von großem Vorteil ist weiterhin, daß das Fluoreszenzmikroskop keine Ölimmersion braucht, sondern daß schon eine 180 fache Vergrößerung genügt.
5. Infolge der schwächeren Vergrößerung ist das Gesichtsfeld im Fluoreszenzmikroskop wesentlich größer als im Tageslichtmikroskop.
6. Der eindrucksvolle Kontrast zwischen den leuchtenden Tuberkelbazillen und dem dunklen Untergrund, ferner das zahlreichere Vorhandensein der Tuberkelbazillen und das größere Gesichtsfeld ermöglichen ein einfaches Auffinden im Fluoreszenzmikroskop. Die Durchmusterung eines Auramin-Präparates ist für das Auge müheloser und erfolgt schneller als die Untersuchung eines Ziehl-Neelsen-Ausstriches.
7. Das Auramin-Präparat ist einfacher herzustellen als das Ziehl-Neelsen-Präparat.

Literaturverzeichnis.

Ziehl: Deutsche med. Wochenschrift 1882 S. 451.

Neelsen: Fortschritt der Medizin 1885 S. 22.

Reploh, H. u. Josephs, A.: Med. Welt 1935 S. 1070.

Johannson: Zbl. Bakter. u. s. w. I Orig. 1938 Bd. 141 S. 424.

Hagemann, Paul K. H.: Fluoreszenzfärbung von Tuberkelbakterien mit Auramin. Münchener med. Wochenschrift 1938 Nr. 28 S. 1066.

Haitinger, Max: Fluoreszenzmikroskopie. Ihre Anwendung in der Histologie und Chemie. Akad. Verlags-Gesellschaft Leipzig 1938.

Hagemann, Paul K. H.: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über Virus und andere Mikroben. Zbl. Bakter. u. s. w. 1937 Bd. 140 S. 184.

Hagemann, Paul: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Leprabakterien im Nasenschleim und im Blut. Deutsche med. Wochenschrift 1937 S. 514.

Hagemann, Paul K. H.: Virus-Fluoreszenzmikroskopie. Münchener med. Wochenschrift 1937 S. 761.

Gerlach, F.: Über Versuche zur Sichtbarmachung und Züchtung spezifischer Mikroorganismen bei Virus-Infektionskrankheiten und bösartigen Geschwülsten. Wiener Tierärztliche Monatsschrift 1938 S. 165.

Herrmann, Werner: Der Nachweis von Tuberkelbazillen mit dem Fluoreszenzmikroskop. Deutsche med. Wochenschrift 1938 S. 1354.

Dabelstein: Das Fluoreszenzmikroskop in der laufenden Tuberkulosediagnostik. Zbl. Bakter. u. s. w. Bd. 143 S. 242.

Keller, Ch. J.: Vereinfachter Nachweis von Tuberkelbazillen im Fluoreszenzlicht. Münchener med. Wochenschrift 1938 S. 2024.

Küster, Hellmut: Untersuchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop. Deutsche med. Wochenschrift 1939 S. 92.

Küster, Hellmut: Untersuchungen über den Nachweis von Virus in menschlichen Tumoren mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Frankfurter Zeitschrift für Pathologie 53. Bd. 1939.

Keller, Ch. J.: Der Nachweis von Diphtheriebazillen mit einem neuen Fluoreszenzmikroskop. Wiener med. Wochenschrift 1939 S. 329.

Bachmann, W.: Über den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Tuberkelbazillen und anderer Erreger. Münchener med. Wochenschrift 1939 S. 637.

Clauberg, K. W.: Über die Verwendbarkeit des Fluoreszenzmikroskopes in der bakteriologischen Praxis, zugleich über die Frage des Vorkommens virusartiger Mikroorganismen in menschlichem Krebsgewebe. Kli. Wochenschrift 1939 S. 632.

Bachmann, W. und Finke, L.: Über die fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Tuberkelbazillen im Gewebe. Deutsche med. Wochenschrift 1939 S. 1474.

Didion, Hans: Über den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Tuberkelbakterien. Kli. Wochenschrift 1939 S. 1315.

Mehdi-Reza-Nour: Über den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Tuberkelbakterien im Auswurf. Med. Diss. Berlin 1939.

Finke, Lothar: Über den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Tuberkelbazillen in Ausstrichen und Gewebsschnitten. Archiv für Hygiene und Bakteriologie. Bd. 123 S. 345.

Müller, R.: Lehrbuch der Hygiene II 1939 S. 212.

Jung, J. W.: Kann die Fluoreszenzmikroskopie den Tierversuch beim Tuberkelbazillennachweis ersetzen? Deutsches Tuberkulose-Blatt 1940 S. 65

Rihl, Heinz: Erfahrungen über den Tuberkelbazillennachweis mit dem Fluoreszenzmikroskop. Wiener kli. Wochenschrift 1940 S. 322.

Für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die vielen Ratschläge danke ich Herrn Professor Dr. med. et med. vet. F. Küster recht herzlich.

Lebenslauf.

Am 27. August 1914 bin ich geboren in Schramberg im Schwarzwald als Sohn des Betriebsleiters Franz Storz und dessen Ehefrau Albertine, geb. Nagel. Ich besuchte die Grundschule und die Realschule in Schramberg und dann die Oberrealschule in Tübingen am Neckar. Nach bestandenem Abitur Ostern 1933 an der Oberrealschule in Tübingen studierte ich Medizin an den Universitäten Tübingen, Breslau, Hamburg und Frankfurt a. M. und schloß mein Studium im Sommer-Semester 1939 in Frankfurt a. M. mit dem medizinischen Staatsexamen ab. Am 1. September 1939 erhielt ich meine Bestallung als Arzt. Zuerst war ich 6 Monate Pflichtassistent in der Medizinischen Universitäts-Klinik in Frankfurt a. M. Seit Februar 1940 führe ich im Auftrage der Ärztekammer München die Praxis eines Arztes und Städtischen Krankenhausarztes in der bayerischen Ostmark weiter.

GUSTAV MAIER, SCHRAMBERG